

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-53489

(P 2 0 0 2 - 5 3 4 8 9 A)

(43) 公開日 平成14年2月19日 (2002. 2. 19)

(51) Int. Cl. ⁷

識別記号

F I

テマコード (参考)

A61K 38/00

A61P 21/00

4C084

A61P 21/00

A61K 37/02

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全15頁)

(21) 出願番号 特願2000-238112 (P 2000-238112)

(22) 出願日 平成12年8月7日 (2000. 8. 7)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 000124269

科研製薬株式会社

東京都文京区本駒込2丁目28番8号

(72) 発明者 花井 淑晃

茨城県つくば市妻木1578-3 静荘101

(72) 発明者 征矢 英昭

茨城県つくば市並木3-7-610

(72) 発明者 岩崎 元明

茨城県つくば市春日3-10-32 ハイツイエ

コー 212

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋肉増強剤・筋肉減衰の予防・治療剤

(57) 【要約】

【課題】 筋量の減少、筋萎縮及び筋疲労をおこしている場合並びに筋力を増強したい場合において、筋肉に直接作用し、迅速に筋量を増やし、筋力を増強することができ、ヒトを含む種々な動物に対する安全性が高い、筋肉増強剤及び／又は筋肉減衰の予防及び／又は治療剤を提供する。

【解決手段】 D-アラニル-3-(ナフタレン-2-イル)-D-アラニル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド及び／又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、筋肉増強剤及び／又は筋肉減衰の予防及び／又は治療剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 D-アラニル-3-(ナフタレン-2-イル)-D-アラニル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド及び/又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤。

【請求項2】 該有効成分がD-アラニル-3-(ナフタレン-2-イル)-D-アラニル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミドの酸付加塩である請求項1記載の筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤。

【請求項3】 該有効成分がD-アラニル-3-(ナフタレン-2-イル)-D-アラニル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド二塩酸塩である請求項1記載の筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤。

【請求項4】 筋肉が骨格筋であることを特徴とする請求項1記載の筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤。

【請求項5】 骨格筋が速筋型骨格筋であることを特徴とする請求項4記載の筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤。

【請求項6】 速筋型骨格筋が腓腹筋、足底筋または長指伸筋であることを特徴とする請求項5記載の筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤。

【請求項7】 リハビリテーション、筋肉トレーニング、エクササイズ及び鍼から選択される筋運動または筋刺激と組み合わせて適用することを特徴とする、請求項1記載の筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、D-アラニル-3-(ナフタレン-2-イル)-D-アラニル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド(以下ブラルモレリンと略記することがある)及び/又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】整形外科的疾患または事故や病気の場合に安静加療時の不活動により筋萎縮がおきたり、宇宙のような無重力下では抗重力筋の筋萎縮がおきたりなど、筋萎縮及び筋量減少をおこす場合がある。また、上記以外の場合でも、高齢者などにおいて筋肉強化が望まれる場合がある。

【0003】筋量減少の治療薬及び筋肉増強剤としては、成長ホルモン(Growth hormone; 以下GHという)の効果が検討され、その有用性が示唆されており、これら

の研究では、リコンビナントヒトGH(recombinant human GH; 以下rhGHという)が通常用いられている。しかしながら、成長ホルモンは筋肉以外にも作用するために副作用の問題があり、また分子量がアミノ酸191個と大きいために投与時における耐用性の問題があった。

【0004】最近、成長ホルモンと比べてはるかに分子量が小さく構造的には異なるが同様な作用を有するものとして、GH遊離促進ペプチド(以下Growth Hormone Releasing Peptide; GHRPと略す)及びGH遊離促進物質(以下GH secretagogue、GHSと略す)が発見され、研究がすすめられている。その作用機構についても、GHRPは下垂体での成長ホルモン分泌直接作用だけでなく、視床下部中の弓状核での成長ホルモン分泌促進因子(以下GHRHと略記することがある)の分泌作用および室周囲核でのソマトスタチンの分泌抑制作用を示すことがわかってきている。

【0005】従来のGHS製剤について報告された成長ホルモン様の作用(WO00/12047等)は、上記作用機構に基づくものであり、GHSが下垂体GHホルモン分泌を促進させ、そのGHを介して、全身的に作用させるものであった。従って、従来のGHS製剤は、所望部位での効力が弱く、投与量を多くしないと効果がないなどの問題があった。

【0006】一方、GHSまたはGHRPについて実際の筋萎縮の治療効果及び筋肉増強の効果についての報告はない。

【0007】GHRPの一つであるブラルモレリンについても、そのGH分泌能や生体への毒性を中心に検討がなされているが、実際の生体への成長促進作用についての検討は未だ十分ではなく、特に、筋肉への同化作用に着目した検討は行われていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、下垂体及び視床下部への作用によってGHを分泌させると共に、部位特異的にすなわち筋肉にも直接作用して、迅速に筋量を増やすことができる、筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤を提供することである。また、本発明のさらなる目的は、副作用が少なく長期投与に耐えられ、投与時の患者に対する物理的・生理的負担が少ない、筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、GHRPの一つであるブラルモレリンの筋肉における成長促進、萎縮抑制効果を検討した結果、ブラルモレリンが、GHを分泌させる他に、筋肉に直接作用し、上記課題を解決することを見出し、本願発明のブラルモレリン含有筋肉増強剤及び/又は筋肉減衰の予防及び/又は治療剤を完成した。

【0010】本発明は、ブラルモレリン及び/又はその

塩を有効成分として含有することを特徴とする、筋肉増強剤及び／又は筋肉減衰の予防及び／又は治療剤（以下「本願製剤」という）を提供する。

【0011】好ましい態様としては、以下のものがあげられる。

【0012】本発明は、有効成分がブラルモレリンの酸付加塩であることを特徴とする前記製剤を提供する。

【0013】本発明は、有効成分がブラルモレリン二塩酸塩であることを特徴とする前記製剤を提供する。

【0014】本発明は、適用される筋肉が骨格筋であることを特徴とする前記製剤を提供する。

【0015】本発明は、適用される骨格筋が主として速筋型骨格筋であることを特徴とする前記製剤を提供する。

【0016】本発明は、適用される速筋型骨格筋が腓腹筋、足底筋または長指伸筋であることを特徴とする前記製剤を提供する。

【0017】本発明は、リハビリテーション、筋肉トレーニング、エクササイズ及び鍼から選択される筋運動または筋刺激と組み合わせて適用することを特徴とする、前記製剤を提供する。

【0018】

【発明の実施の形態】ここでいう「筋肉増強」とは、筋量が増加したりまたは筋の張力が大きくなることをいう。また、「筋肉減衰」とは、筋量が減少したりまたは筋の張力が小さくなることをいい、筋萎縮、筋量減少及び筋疲労を包含する。具体的疾患としては、高齢者における筋萎縮、整形外科的疾患または事故や病気の場合における安静加療時の不活動による筋萎縮、宇宙のような無重力下において生じた筋萎縮及び海底のような特殊な圧力下の環境において生じた筋疲労などがあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0019】本願製剤が適用しうるのは、あらゆる種類の筋肉（骨格筋、平滑筋、心筋）であるが、特に骨格筋に適用するのが好ましい。「骨格筋」とは、顔面筋、咀嚼筋、頸筋、胸筋、腹筋、背筋、上肢の筋肉及び下肢の筋肉などが包含される。

【0020】ここでいう「速筋型骨格筋」は、速筋線維が優勢な骨格筋をいい、例えば、腓腹筋、足底筋、長指伸筋などがあげられる。一方、「遅筋型骨格筋」は、遅筋線維が優勢な骨格筋をいい、例えば、ヒラメ筋、長内転筋などがあげられる。

【0021】ここでいう「速筋線維」とは、収縮速度が速く、短時間の強い収縮に適する筋線維をいい、「遅筋線維」とは、収縮速度が遅く、持続的な緊張の維持に適する筋線維をいう。

【0022】本願製剤は、骨格筋の中でも、特に、速筋型骨格筋（例えば、腓腹筋、足底筋、長指伸筋）に顕著な効果を示す。ただし、足底筋は、4つ足動物では発達しているがヒトにおいては退化しているので、ヒトにお

いては、足底筋以外の速筋型骨格筋、例えば、腓腹筋、長指伸筋に顕著な効果を示す。このことは、より速く、細かい運動をつかさどっている速筋型骨格筋が、本願製剤によって特異的に筋量が増え、筋力が増強されることを意味するので、運動機能の回復に有効である。

【0023】本願製剤は一定の筋運動または筋刺激と組み合わせることでその効果を促進できる。

【0024】ここでいう「筋運動または筋刺激」とは、回復を目的として、筋肉を動かすこと（例えばリハビリテーション、筋肉トレーニング、エクササイズ等）及び外部から刺激を与えること（例えば鍼等）をいう。

【0025】本願製剤は、ラットでの7週間連続投与の結果、筋湿重量として、10%～20%、筋タンパク重量として、20%以上増加させることができる。

【0026】本発明の製剤において、用いられる有効成分は、ブラルモレリン及び／又はその塩である。ブラルモレリンは、公知の方法により、例えば、特表平7-507039記載の方法により製造することができる。

【0027】ブラルモレリンの塩とは、酸付加塩、アルカリ金属との塩、アルカリ土類金属との塩があげられる。この酸付加塩を形成しうる酸としては、例えば塩酸、硫酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸などの無機酸、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グルコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、マレイン酸、フタル酸、フェニル酢酸、安息香酸、サリチル酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、蔞酸、トリフルオロ酢酸などの有機酸、アルギニン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸などの中から、医薬上許容される酸付加塩を形成しうるものが適宜選ばれる。アルカリ金属との塩としては、ナトリウム、カリウム等があげられ、アルカリ土類金属としては、カルシウム、マグネシウム等があげられる。

【0028】酸付加塩が、薬効の点で、好ましく用いられる。また、好ましい酸付加塩は、塩酸塩であり、より好ましくは二塩酸塩である。

【0029】本発明の製剤において、ブラルモレリン及びその塩を2種以上組み合わせて用いてもよい。

【0030】本発明に用いられるブラルモレリン及び／又はその塩は、公知の製剤技術により、単独または薬理的に許容しうる担体、添加剤等とともに、通常の経口型製剤及び非経口型製剤、例えば、液剤（注射剤、点鼻剤、シロップ剤、ドライシロップ剤など）、錠剤、トローチ剤、カプセル剤（硬、軟、マイクロカプセル等）、散剤、細粒剤、顆粒剤、軟膏剤、坐剤、ハップ剤等などに製剤可能であり、また、ドラッグデリバリーシステム（例えば、徐放剤等）などの剤型にも製剤可能である。

【0031】本願の製剤に用いることができる担体、添加剤等としては以下のような通常医薬品の調剤に使用されるものがあげられる：例えば生理食塩液、水（常水、

蒸留水、精製水、注射用水など)、リンゲル液等の水性溶剤、例えば、油性溶剤(ゴマ油、落花生油などの植物油など)、水溶性溶剤(プロピレングリコール、マクロゴール、エタノール、グリセリンなど)等の非水性溶剤、例えばカカオ脂、ポリエチレングリコール、マイクロクリスタリンワックス、サラシミツロウ、流動パラフィン、白色ワセリン等の基剤、例えば蔗糖、デンプン、マンニト、ソルビット、乳糖、ぶどう糖、セルロース、タルク、磷酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビヤゴム、ポリエチレングリコール、蔗糖、デンプン等の結合剤、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルデンプン、炭酸水素ナトリウム、磷酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑沢剤、例えばクエン酸、メントール、グリシン、ソルビトール、オレンジ末等の矯味剤、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、ベンジルアルコール、クロロブタノール、四級アンモニウム塩(塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムなど)等の保存剤及び防腐剤、例えばアルブミン、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール等の安定剤、例えばメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁化剤、例えばグリセリン、ソルビトール等の可塑剤、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース等の分散剤、例えば塩酸等の溶解補助剤、例えばモノステアリン酸ナトリウム等の乳化剤、例えば塩化ナトリウム等の電解質並びに例えば糖アルコール類、糖類及びアルコール類等の非電解質の浸透圧調整剤、着香剤等。

【0032】また、経口製剤の場合、ブラルモレリン吸収性促進のために、特開平10-456194公報記載のような結晶セルロース(「アビセル」[商品名、旭化成工業(株)製]等、水膨潤性セルロース(カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルボキシメチルセルロースナトリウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース等)を含むことができる。

【0033】本製剤中に含まれるブラルモレリン及び／又はその塩の含有量は所望の効果を奏する限り特に限定されないが、製剤中、好ましくは約0.0001~約10w/v%、より好ましくは約0.001~約2w/v%の濃度になるように含有することができる。

【0034】本願製剤は、通常、静脈注(点滴を含む)、経口、経皮、皮下、筋肉内、点鼻、動脈注射等の手段により、ヒトを含む脊椎動物(例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、馬、羊、サル等)に投与される。

【0035】本願製剤の投与量は、患者の年齢、体重、

症状、投与法などにより異なるが、ブラルモレリンまたはその塩を、成人(体重50~70kg)の筋肉増強、筋肉減衰に伴う疾患の予防、治療のために使用するに際し、1日量は、非経口投与、例えば静脈内投与では、体重1kg当たり好ましくは約0.1~約100 μ gの量で、さらに好ましくは約1~約10 μ gの量で点滴あるいは1回ないし4回に分けて、経口投与では体重1kg当たり好ましくは約20 μ g~約2000 μ gの量で、さらに好ましくは約40 μ g~約1000 μ gの量で1回ないし4回に分けて投与することができる。

【0036】本願製剤は、例えば、高齢者における筋萎縮、整形外科的疾患または事故や病気の場合における安静加療時の不活動による筋萎縮、宇宙のような無重力下において生じた筋萎縮及び海底のような特殊な圧力下の環境において生じた筋疲労などの、筋萎縮、筋量減少及び筋疲労、並びに筋肉増強に有効である。また、筋に直接作用するので、局部的に筋萎縮、筋量減少及び筋疲労をおこしたような場合並びに局部的に筋肉増強したい場合にも有効である。

【0037】

【実施例】以下に製剤例及び実施例を示して具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【0038】

製剤例

製剤例1

点鼻剤組成例(1ml中)

ブラルモレリン二塩酸塩	1mg
塩酸ベンザルコニウム	0.05mg
精製水	適量
	1ml

【0039】

製剤例2

顆粒剤組成例(1000mg中)

ブラルモレリン二塩酸塩	10mg
コロイダルタイプ結晶セルロース	400mg
マンニトール	574mg
ヒドロキシセルロース	16mg
	1000mg

【0040】実施例

実施例1 ブラルモレリンの正常ラット、もしくはMSG(mono sodium glutamate)処置成長遅滞ラット骨格筋の成長促進効果

外来の成長ホルモン若しくはブラルモレリンの作用を調べる目的で、内因的な成長ホルモンの関与を可能な限り除外するために、成長ホルモン分泌促進因子が放出される視床下部のGHRHニューロン分布域に障害をおこしたMSG処置成長遅延ラットを用いた。

【0041】MSG処置成長遅延ラットは、新生仔期ラットに、生後1、2日目の2回、体重1kg当たり4m

gのMSGを皮下投与して作製した。この処置により、視床下部のGHRHニューロン分布域に障害がおき、GHRH刺激によるGH分泌が抑制され、その結果として全身的な成長遅延が生じた、ラットをMSG処置ラット（または、MSGラット）と呼ぶ。

【0042】従って、MSG処置ラットでは、プラルモレリン等のGHRPが主に作用する視床下部での作用、すなわち視床下部中の弓状核でのGHRH分泌作用および室周囲核でのソマトスタチンの分泌抑制作用が減少するので、プラルモレリンの筋肉に対する成長促進効果が正常ラットに比べて著しく弱いものと考えられる。

【0043】成長期の正常ラットとMSG処置成長遅延ラットへ各々プラルモレリン二塩酸塩（以下KP-102という）を投与し、骨格筋に対してプラルモレリンがどの程度の成長促進効果を持つのかについてin vivoで検討した。

【0044】筋肥大の評価としては、摘出筋の重量が最も基本的な指標となるので、第1に筋湿重量を測定した。しかし、筋線維の肥大と筋湿重量の増加は必ずしも一致しない場合【水ぶくれなどで重量が増加する場合（Timpson, 1990）等】があるので、収縮装置としての機能を考慮した実質的な筋肥大の評価のために、筋線維横断面積及び収縮タンパクであるミオシンタンパクの評価を行った。

【0045】1. 被験動物並びに被験物質（投与量及び投与スケジュール）

被験動物としてSprague-Dawley系の雌ラットを用いた。正常、MSGラットは同腹の雌ラット（母娘20匹）であり、MSG投与後（正常ラットは無処置）、4週齢まで、7:00~19:00を明期とする明暗サイクルのもと、自由摂水、自由摂食で飼育した。被験物質として、プラルモレリンは、特表平7-507039記載の方法によって製造したプラルモレリン二塩酸塩（以下KP-102という）を、またrhGHは、ジェノトロピン（Genotropin）（ファルマシア・アップジョン社製、日本）を用いた。KP-102は生理食塩水で0.1mg/mlに、rhGHは生理食塩水で1IU/ml（ここで、IUは、国際単位）に調製して投与した。正常ラット及びMSGラットに対して、成長期である4週齢から44日間にわたり100μg/kgのKP-102または生理食塩水を1日1回皮下投与し、その骨格筋への影響を調べた。MSG処置ラットに対しては、1IU/kgのrhGHを用いて同様にしてその骨格筋への影響を調べた。

【0046】ラットは以下の5群に分けられた（nの値は、一群当たりのラットの数を表す）。

- 1) 正常-生食群（n=6）；正常ラットに生理食塩水を連続投与
- 2) 正常-KP-102群（n=5）；正常ラットにKP-102を連続投与

3) MSG-生食群（n=8）；MSG処置ラットに生理食塩水を連続投与

4) MSG-rhGH群（n=8）；MSG処置ラットにrhGHを連続投与

5) MSG-KP-102群（n=8）；MSG処置ラットにKP-102を連続投与

【0047】2. 体重、体長及び尾長の測定

上記各群の被験動物の体重、体長及び尾長を測定し、その平均値を求めた。その結果を図1に示す。

【0048】3. 被験筋

本実験において、ラット後肢下腿に位置するヒラメ筋、足底筋、長指伸筋、腓腹筋の四筋を用いた。これらの筋は、骨格筋の適応の研究において、GH投与を含む種々の実験で頻繁に用いられており、それらと比較検討が可能である点で有用である。

【0049】以下に、各筋の解剖学的、生理、生化学的特性をまとめる。

1) ヒラメ筋 全筋線維数の80から90%が遅筋線維よりなる、下腿における代表的な遅筋である。下腿三頭筋では最も脛骨に近い部分に位置する。安静時にも姿勢維持筋として持続的な筋活動が見られるという特性を持つ。

2) 足底筋 腓腹筋に包まれる形で存在しており、全筋線維数の約95%が遅筋線維よりなる典型的な速筋型の筋である。ヒトでは退化しているが、ラットでは腓腹筋とともに腓腹屈の主動筋としてはたらく。

3) 長指伸筋 下腿の前脛骨筋の裏側に位置し、95%以上が速筋線維である。今回分析に用いる中では最も速筋型の筋である。

4) 腓腹筋 腓腹筋はラット下腿で最も大きい筋であり、また、内側と外側に大まかに分けることができる。さらに、各々、表層部と深層部では筋線維組成が大きく異なり、表層はほとんど全てが遅筋線維からなるが、深層部では約50%が遅筋線維よりなっている。今回分析に用いる筋の中では最も重量が大きい。走運動時には足底筋とともに、足底屈の主動筋として重要な働きを持つ。

【0050】4. 筋湿重量の測定

筋湿重量の測定には、ヒラメ筋、足底筋、長指伸筋、及び腓腹筋の内側の表層部を用いた。ラットを屠殺後に、左右両側の各筋を速やかに摘出した。生理食塩水で洗浄した後に余分な結合組織および腱、神経等を除去し、筋湿重量として秤量した。

【0051】4つの被験筋の各々左右の筋の筋湿重量の平均値を求め、また、その値を各体重で割って体重当たりの筋湿重量を求めた。筋湿重量、および体重当たりの筋湿重量の結果を図2（正常ラット）及び図3（MSG処置ラット）に示す。

【0052】秤量後、片側の筋をRNA分析用として、液体窒素中で急冷固定した。反対側の筋は蛋白と組織化学的分析のために、液体窒素中のイソペンタン中で急冷固

定した。

【0053】5. 筋総蛋白含量、筋総蛋白濃度及びミオシン重鎖蛋白量の測定方法

KP-102によって外側腓腹筋において有意な筋重量の増加が認められたので、外側腓腹筋を用いて、以下のタンパク含量を測定した。

【0054】1) 筋のホモジナイズと蛋白量の定量法
ディープフリーザド(-80℃)中で保存しておいたラット右足腓腹筋外側部のサンプルを、リン酸バッファー

(20mMリン酸水溶液(pH7.0))中で、ポリドロンを用いてホモジナイズした。ホモジナイズ中は温度の上昇による蛋白分解を避けるためにサンプルは水中に維持した。ホモジネートをマイクロチューブに分注し、20%SDSを加えて100℃で3分間煮沸した。その後、10000×gで1分間遠心して不溶物を沈殿させ、上澄みを回収した。この上澄み溶液中の蛋白濃度を、アルブミンをスタンダードとしたBCA法(Bi Cinchoninic Acid 法。Smith et al., Anal. Biochem., 150, 78-85)を用いて定量した。

【0055】筋総蛋白含量は、上記ホモジネートにおいて定量した蛋白濃度とホモジネート溶液の容積との積より算出した。筋蛋白濃度は、(筋総蛋白含量÷筋湿重量)×100で求めた。筋総蛋白含量及び筋総蛋白濃度の結果について、図4に示す。筋総蛋白含量または筋総蛋白濃度と筋湿重量との間との相関関係について図7に示す。

【0056】2) SDS-PAGE

蛋白量を定量した蛋白溶液を、ローディングバッファー(loading buffer)(62.5mMトリス(pH6.8)、2%SDS、10%グリセロール、1%2-メルカプトエタノール、0.02%プロモフェノールブルー)により0.1mg/mlに調整し、そのうち30μl(3μg 蛋白質)をSDS-PAGEにより分離した。分離ゲルはグリセロールを含む7.5%アクリルアミドを用いた。電気泳動は、ATTO社製の16×18×0.75のスラブゲル電気泳動装置を用い、4℃のクロマトチャンバー内で、48時間、200Vで行った。

【0057】泳動の終了したゲルは、速やかにCBB染色前固定液中で30分間インキュベート後、CBB染色液で30分染色を行った。その後、脱色液でゲルを2回濯ぎ、色素を吸着させるペーパータオルとともにたっぷりの脱色液中に入れて、オーバーナイトインキュベートした。脱色中、ペーパータオルを2回入れ替えた。染色の終了したゲルは蒸留水中で30分洗った後、セロファンに挟んでゲルドライヤーを用いて乾燥させた。このゲルをスキャナーによりコンピューター画像として取り込み、NIH Imageソフトのgel plotting macroを用いて、分離されたミオシン重鎖バンドの光学的密度を定量し、ミオシン重鎖蛋白量(値は任意:arbitrary U)として評価した。今回行ったSDS-PAGEでは、ミオシン重鎖分子は分子種、Type I、TypeIIa、IIId、IIbの4つのバンドに分離さ

れる。各分子種について、単位蛋白量(3μg)で測定した値に筋蛋白量をかけて求めた総ミオシン重鎖蛋白量の結果を図5に示す。図6に単位蛋白量(3μg)あたりのミオシン重鎖蛋白量及び、この値から算出した各ミオシン重鎖分子種ごとの割合を示す。総ミオシン重鎖蛋白量は、上記SDS-PAGEゲルの画像解析によって得た単位蛋白量当たりのミオシン重鎖のバンドの光学的密度(単位は任意の値:arbitrary U)と、筋の総蛋白含量との積より求めた。その結果を図4に示す。筋総ミオシン重鎖蛋白量または筋蛋白当たりのミオシン重鎖蛋白量と筋湿重量との間との相関関係について図7に示す。

【0058】6. 筋線維横断面積の評価

筋線維横断面積の分析は、筋湿重量での増加が顕著であったMSGラットにおいて行い、MSG群とhGHまたはKP-102投与群との値を比較した。また、筋線維横断面積は筋線維タイプによって差があることが報告されているために、筋線維タイプを同定し、それぞれのタイプごとに横断面積を求め、評価した。

【0059】第1に、各筋線維タイプごとに評価するために、ミオシン-ATPase染色を行った横断切片上で行った。クリオスタット中で薄片を作成し、インキュベーション前にpH4.6及びpH10.3のミオシン-ATPase染色を行った。

【0060】各ミオシン重鎖分子種の酵素活性のpHに対する安定性の違いに基づいて、各線維の染色強度によって、前者(pH4.6)では筋線維タイプは、TypeI、TypeIIa、TypeIIbおよびdの四種類に、後者(pH10.3)ではTypeI、TypeIIaおよびd、TypeIIbの四種類に分類できる。

【0061】ラット腓腹筋外側において、深層部ではTypeIIb線維が存在しないため、pH4.6染色の切片上で、TypeI、TypeIIa、TypeIIIdの評価を行い、また、表層部ではTypeIおよびTypeIIaが存在しないために、pH10.3染色の切片上で、TypeIIId、およびTypeIIbの評価を行った。TypeIIIdの値は、深層部の値を採用した。

【0062】筋線維横断面積の同定には、×10の対物レンズを取り付けた顕微鏡に連結されたCCDカメラにより、肉眼で分析が可能である大きさに拡大された切片のコンピューター画像を取り込み、その画面上で行った。分析にはNIH Imageソフトを用い、画像上の各筋線維ごとのピクセル数を同定し、同様な方法で取り込んだ面積標準値により補正し、筋線維横断面積を計算した。筋線維横断面積の評価は、各タイプごとに、20から50本程度の筋線維に対しておこなった。筋線維横断面積の結果を図8に示す。

【0063】7. 分析方法

正常群と正常+KP-102群の間には対応のない検定を用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。MSG群、MSG+rhGH群、MSG+KP-102群の比較には分散分析を行い、群間の分散が有意($p < 0.05$)であった筋については、s

cheffe's検定をpost hoc testとして用いて各群の差の有意性について検討した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【0064】8. 結果

1) 体重、体長、および尾長について (図1)

正常群と正常群+KP-102群との比較では、体重のみが、正常群+KP-102群で約12%有意 ($p < 0.05$) に高かった。体長および尾長については有意な差は認められなかった。MSG群では、KP-102またはrhGHのいずれの投与群との間でも、体重、体長、および尾長のいずれにおいても有意な差は認められ

【0065】2) 筋湿重量について

(1) 正常群の筋湿重量について (図2)

4つの被験筋のうち外側腓腹筋重量のみが正常群に対して正常+KP-102群で約14%有意 ($p < 0.05$) に高かった。体重当たりの筋重量では、どの筋にも差は認められなかった。

【0066】(2) MSG群の筋湿重量について (図3)

ヒラメ筋、長指伸筋重量においてはKP-102またはrhGHいずれの投与群でもMSG群との間に差は認められなかった。足底筋重量ではMSG群に対してMSG+KP-102群が約14%有意 ($p < 0.05$) に高かった。また、外側腓腹筋重量ではMSG群に対してMSG+rhGH群 (約17%) およびMSG+KP-102群 (約15%) がそれぞれ有意 ($p < 0.05$) に大きかった。外側腓腹筋重量では体重当たりの分析においても、MSG群に対してMSG+KP-102群が約13%有意 ($p < 0.05$) に大きかった。

【0067】3) 筋総蛋白含量及び筋蛋白濃度について (図4及び7)

正常群、MSG処置群の両方において、筋総蛋白含量は、筋湿重量の結果とほぼ同じであり、正常群に対して正常+KP-102群が、また、MSG群に対して、MSG+KP-102群およびMSG+rhGH群が有意に多い蛋白含量であった (図4)。また、筋総蛋白含量と筋湿重量との間には有意な正の相関関係が認められた (図7)。筋蛋白濃度は、正常群及びMSG処置群のいずれの群間にも差に統計的有意性は認められず、約23%の蛋白濃度であった (図4)。また、筋蛋白濃度と筋重量との間に相関関係は認められなかった (図7)。

【0068】4) ミオシン重鎖について (図4、5、6及び7)

正常群と正常+KP-102投与群では、いずれのミオシン重鎖分子種にも、また、これらの和である総ミオシン重鎖にも蛋白含量において有意な差は認められなかった

(図4、5)。しかしながら、MSG群では、TypeIb、および、総ミオシン重鎖において、筋総蛋白含量と同じく、MSG群に対して、MSG+KP-102群およびMSG+rhGH群が有意に多いミオシン重鎖蛋白含量であ

た (図4、5)。単位蛋白あたりのミオシン重鎖蛋白含量では、正常ラットのTypeIにおいてKP-102投与群が有意に低い値であった他は、いずれの群間においても統計学的に有意な差は認められなかった (図6)。総ミオシン重鎖蛋白量と筋重量との間には、有意な正の相関関係が認められたが、蛋白当たりの総ミオシン重鎖蛋白量と筋重量との間には相関関係は見られなかった (図7)。

【0069】5) 筋線維横断面積について (図8)

rhGH投与群では、TypeIIa、TypeIIbおよびTypeIの各筋線維タイプで、MSG群よりも有意に大きい筋線維横断面積であった。KP-102投与群では、いずれの筋線維タイプもMSG群に対して有意な差は認められなかったが、全体的には大きい傾向があった (図8)。

【0070】9. 考察

(1) 筋湿重量

上記結果によって、ブラルモレリンが正常及びMSGラットにおいてin vivoで骨格筋に対して成長促進作用を示すことがわかった。また、MSGラットにおけるブラルモレリンの筋湿重量に対する作用に関しては、筋によっては正常ラットと変わらないか、逆に腓腹筋、足底筋ではMSGラットの方が顕著である場合も見られた。

【0071】上述したように正常ラットに比べてブラルモレリンに対するGH分泌応答性が減弱しているMSGラットで、ブラルモレリンが正常ラットと同等以上の骨格筋への作用を示したこと及びブラルモレリンの作用が筋種によって異なったことは、ブラルモレリンの骨格筋への作用は、GH分泌を介したものだけではなく、骨格筋にブラルモレリンの受容体が存在し直接作用しているか、又は、GH以外の作用機序によることを示唆している。

【0072】また、MSGラットにおいて、血中GH濃度がブラルモレリン投与に比べて高くなると予想されるrhGH投与と比較しても、ブラルモレリンが同等以上の骨格筋への作用を示したことから、ブラルモレリンの作用がGH分泌だけに依存していない事が示唆される。

【0073】さらに、MSGラットにおけるブラルモレリンの投与の結果により、ブラルモレリンは、腓腹筋、足底筋などの速筋型の筋種に特異的に成長促進作用を示すことがわかった。これは、筋肉における受容体の分布、または感受性が筋種によって異なることにより、作用の差が生じている可能性が示唆される。

【0074】(2) 筋のタンパク同化作用

筋の総タンパク含量については、ブラルモレリンによって、正常、MSGラットのいずれにおいても有意な増加が認められ、筋湿重量と筋の総タンパク含量との間には、有意の正の相関関係が認められた。またMSGラットではミオシンタンパク含量にも有意な増加が認められた。

【0075】これらの結果は、ブラルモレリン投与によって起こった筋湿重量の増加が、浮腫による水分含量の増加などによるものではなく、収縮装置であるミオシン

を含むタンパク同化作用によるものであることを示している。以上の結果から、プラルモレリンが筋のタンパク同化作用を有効に促進させることが明らかになった。

【0076】実施例2 後肢懸垂ラットを用いたプラルモレリンの骨格筋萎縮抑制効果

プラルモレリンの筋萎縮への作用を動物実験で検討するために、下肢筋群の萎縮モデルである後肢懸垂ラットを用いてプラルモレリンニ塩酸塩（以下、KP-102という）の骨格筋萎縮抑制効果について試験を行った。

【0077】1. 被験動物

被験動物にはSprague-Dawley系の12週齢の成体雌ラットを用いた。実験期間中、実験動物を8:00から20:00を明期とする明暗サイクルのもと、自由摂食、自由摂水で飼育した。予備飼育1週間の後、13週齢時より2週間、以下に説明する後肢懸垂により、下肢筋群を無負荷状態にして、萎縮を起こさせた。懸垂中、KP-102またはrhGHを皮下投与した。

【0078】ラット以下の4群に分けた（Nの値は、一群当たりのラットの数を表す）。

- 1) 正常-生食群（N群，N=8），後肢懸垂していないラットに生理食塩水を連続投与
- 2) 後肢懸垂-生食群（C群，N=8），後肢懸垂したラットに生理食塩水を連続投与
- 3) 後肢懸垂-KP-102群（K群，N=9），後肢懸垂したラットにKP-102を連続投与
- 4) 後肢懸垂-rhGH群（G群，N=8），後肢懸垂したラットにrhGHを連続投与

【0079】2. 後肢懸垂

ラットの下肢筋群を無負荷状態にし、萎縮を起こさせるためにラットの尾部を懸垂した。後肢懸垂によって特に影響を受けるのは姿勢維持筋であるヒラメ筋であり、2週間の懸垂によりヒラメ筋の湿重量が約30%減少し、その他の多くの筋種も有意な萎縮を示した。

【0080】1) 後肢懸垂の準備

後肢懸垂中、被験動物は1匹ずつ鳥かご（40×30×25cm）で飼育した。鳥かごの内壁をラットがしがみつかないようにアクリル版で囲った。さらに、鳥かごの底には足場となる金網を張った。

【0081】2) 後肢懸垂

約10cmの針金の一方に、スナップ付きサルカン（釣り具）を取り付け、反対側は鉤状に加工した。全ての被験動物の尾にキネシオテープをうっ血を起こさないように巻き付けた。その上から、加工した針金を鉤状になっている方を腹側にして、テーピング用ホワイトテープで固定した。鳥かごの天井部に針金を用いてサルカンを固定し、後肢が金網に接することがないように、天井部の針金の長さを調節して被験動物の尾を吊り下げた。正常-生食群については、前肢後肢とも床部に接するように天井部の針金の長さを調節した。この状態で2週間飼育し、その後サンプリングを行った。体重は毎日16:00に

測定した。後肢懸垂期間中も自由摂水、自由摂食であった。

【0082】3. 生理食塩水、KP-102及びrhGHの投与
2週間の後肢懸垂の間、正常-生食群及び後肢懸垂-生食群のラットには生理食塩水を、後肢懸垂-KP-102群にはKP-102（特表平7-507039記載の方法により製造）を、後肢懸垂-rhGH群にはrhGH（ジェノトロピン（Genotropin），ファルマシア・アップジョン社、日本）を、それぞれ1日3回、8:30、12:30、16:30の時間に皮下投与した。投与には、1mlのテルモシリンジと27号のテルモ注射針を用いた。KP-102は300μg/kg体重/日、rhGHは1mg/kg体重/日をそれぞれ3回に分けて投与した。KP-102、rhGHはそれぞれ生理食塩水で0.1mg/ml、0.333mg/mlに調整して投与を行った。正常-生食群及び後肢懸垂-生食群については、他の2群と等量（100μl/100g体重/回）の生理食塩水を投与した。

【0083】4. 被験筋の摘出

被験筋は、ラット後肢に位置するヒラメ筋、足底筋、長指伸筋、外側腓腹筋、前脛骨筋、長内転筋の6筋とした。ヒラメ筋、足底筋、長指伸筋、外側腓腹筋は上述したとおりの筋である。また、前脛骨筋とは、下腿の脛骨前方に位置し、足背屈の主動筋として重要な働きをもつ。90%以上が速筋線維からなる速筋型である。長内転筋とは、約90%が遅筋線維からなり、ヒラメ筋と同様、姿勢維持筋としての働きをもつ。これらの筋は骨格筋の適応の研究において、GH投与を含む種々の実験で頻繁に用いられており、それらと比較検討が可能である点で有用である。

【0084】エーテル麻酔下でラットの左右両側の筋を速やかに摘出し、その後、肝臓、腎臓、副腎、心臓も摘出し、同時に血液を採取した。摘出した各筋は、生理食塩水で洗浄した後に余分な結合組織および腱、神経等を除去し、秤量した。ヒラメ筋及び長指伸筋の筋湿重量の結果について、図9及び10に示す。

【0085】摘出した右側の筋は、蛋白分析のために液体窒素を用いて急冷固定し、そのサンプルを用いて実施例1と同様にタンパク含有量を測定した。左側の筋については、切片分析のため3つに分断し、液体窒素中で冷却したイソペンタンを用いて急冷固定した。摘出した臓器については、秤量した後、副腎を除いて液体窒素中で急冷固定した。

【0086】5. 結果

1) 体重の変化

後肢懸垂-生理食塩水群に比べ、後肢懸垂-プラルモレリン、後肢懸垂-rhGH群では有意に体重が増加した。

2) 筋湿重量の変化

後肢懸垂群はいずれも筋湿重量の減少または減少傾向を示したが、rhGHまたはプラルモレリン投与により、

筋湿重量を増加させ、減少を抑える効果が見られた。後肢懸垂-rhGH群では、外側腓腹筋、足底筋、長指伸筋で後肢懸垂-生理食塩水群に比べて有意に高い筋湿重量が見られた。後肢懸垂-プラルモレリン群では長指伸筋で後肢懸垂-生理食塩水群に比べて有意に高い筋湿重量が見られた。また、後肢懸垂-rhGH群では、外側腓腹筋、足底筋、長指伸筋、前脛骨筋で、後肢懸垂-プラルモレリン群では足底筋、長指伸筋で、正常-生理食塩水群との筋湿重量の有意差が無く、筋湿重量の減少を抑制する作用が見られた。

3) 筋中の蛋白含有量の変化

後肢懸垂によりヒラメ筋、外側腓腹筋で蛋白含有量の有意な減少が見られたが、足底筋、長指伸筋では有意な減少が見られなかった。後肢懸垂-プラルモレリン群では外側腓腹筋で、正常-生理食塩水群との筋蛋白量の有意差が無く、筋蛋白量減少を抑制する作用が見られた。

【0087】6. 考察

本実験における生理食塩水投与群とKP-102投与群またはrhGH投与群との比較から、プラルモレリンまたはrhGHを投与した結果、いずれでも被験筋の数種について湿重量及びタンパク含有量が増加することがわかった。従って、萎縮モデルにおいても、これらの筋に対するタンパク同化作用が有効であることが示唆された。rhGH投与では、腓腹筋、足底筋、長指伸筋、前脛骨筋で有意な湿重量の増加が見られるのに対して、プラルモレリンの作用はrhGHと比較すると小さく、プラルモレリン投与では長指伸筋のみで有意な湿重量の増加が確認された。但し、プラルモレリン投与により、その他の筋でも湿重量の増加傾向は認められ、作用する筋種の傾向と作用の特性はrhGH投与の場合と同じであった。

【0088】実施例1で見られた正常ラット及びMSGラットでの結果に比べて、本実験での後肢懸垂モデルでのプラルモレリンの作用はrhGHと比較してやや弱かったが、この差の原因は主に正常ラット及びMSGラットでの投与が44日間であったのに対して後肢懸垂モデルでの実験では14日間と少なく、さらにプラルモレリンは内因性のGHを分泌させるが、後肢懸垂でのラットのストレスに起因するGH分泌の抑制の影響を受けた可能性が考えられ

る。しかし、本実験での後肢懸垂モデルに対して、プラルモレリンは十分な筋萎縮治療効果を示し、臨床での筋萎縮予防、回復、治療効果が期待できる。

【発明の効果】本願製剤は、筋萎縮、筋量減少及び筋疲労をおこした場合、並びに筋増強したい場合に、筋肉に直接作用して、迅速に筋量を増やし、筋力を増強することが可能である。本願製剤は、筋肉以外の作用をおこさずに、筋肉のみに特異的に作用させることができる。また、プラルモレリンは成長ホルモンに比べてはるかに低分子量であるので、経口、経鼻等の投与が可能である簡便性、製造コストの安さによる経済性等の有用性が期待できるほか、抗体産生の危険性が低く、また、投与量が成長ホルモンより少なく済み、投与時の患者に対する物理的・生理的負担を少なくできる。従って、本願製剤は、種々な有用性が期待され、副作用が少なく長期投与に耐えることができ、ヒトを含む種々な動物に対する安全性が高い。

【図面の簡単な説明】

【図1】正常群と正常群+KP-102群、およびMSG群とMSG+rhGH群、MSG+KP-102群の体重、体長、尾長の比較を表す図である。

【図2】正常群の下肢骨格筋湿重量に対するKP-102連投の効果を表す図である。

【図3】MSG群の下肢骨格筋湿重量に対するrhGHおよびKP-102連投の効果を表す図である。

【図4】筋総蛋白含量、筋蛋白濃度および総ミオシン重鎖蛋白量を表す図である。

【図5】ミオシン重鎖分子種ごとの蛋白量を表す図である。

【図6】筋蛋白当たりのミオシン蛋白量およびミオシン重鎖分子種組成を表す図である。

【図7】筋湿重量と、筋総蛋白含量、筋蛋白濃度、筋総ミオシン重鎖蛋白含量または蛋白当たりのミオシン重鎖蛋白量との相関分析を表す図である。

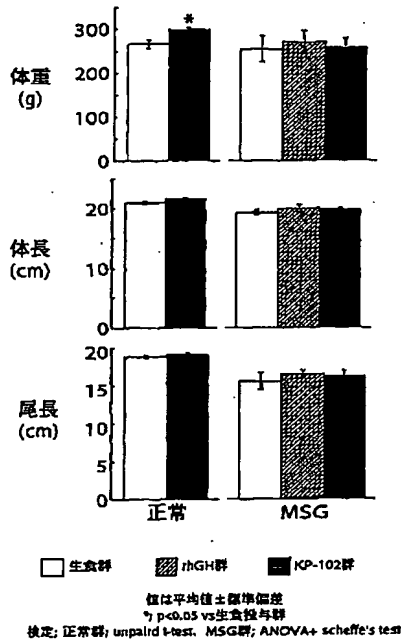
【図8】筋線維横断面積を表す図である。

【図9】ヒラメ筋湿重量を表す図である。

【図10】長指伸筋湿重量を表す図である。

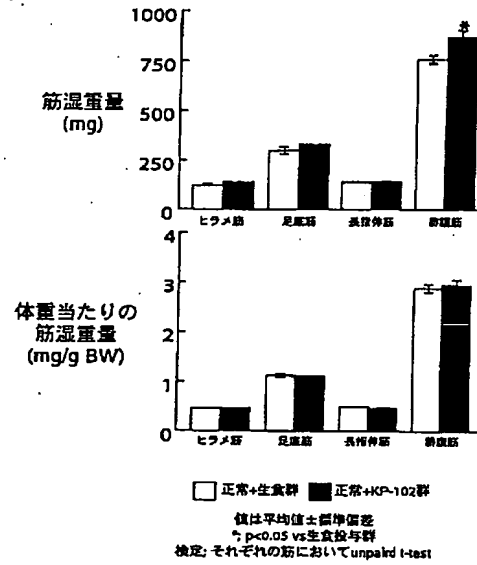
【図 1】

【図 1】正常群と正常群+KP-102群、およびMSG群とMSG+rhGH群、MSG+KP-102群の体重、体長、尾長の比較を表す図



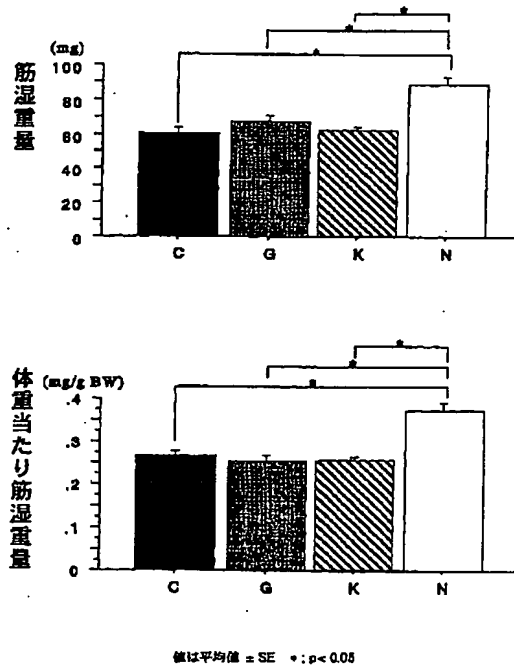
【図 2】

【図 2】正常群の下肢骨格筋重量に対するKP-102投与の効果を表す図



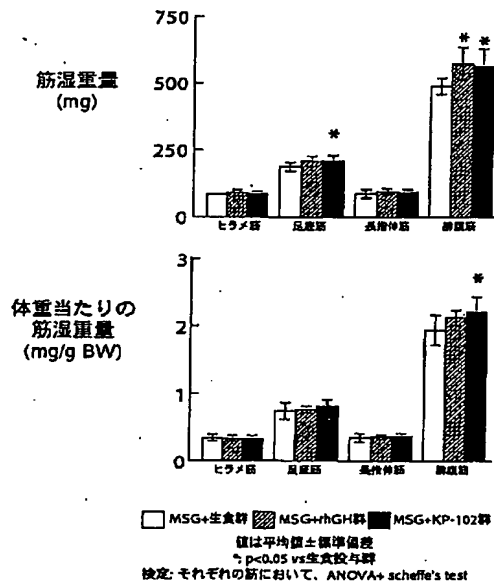
【図 9】

【図 9】ヒラメ筋湿重量



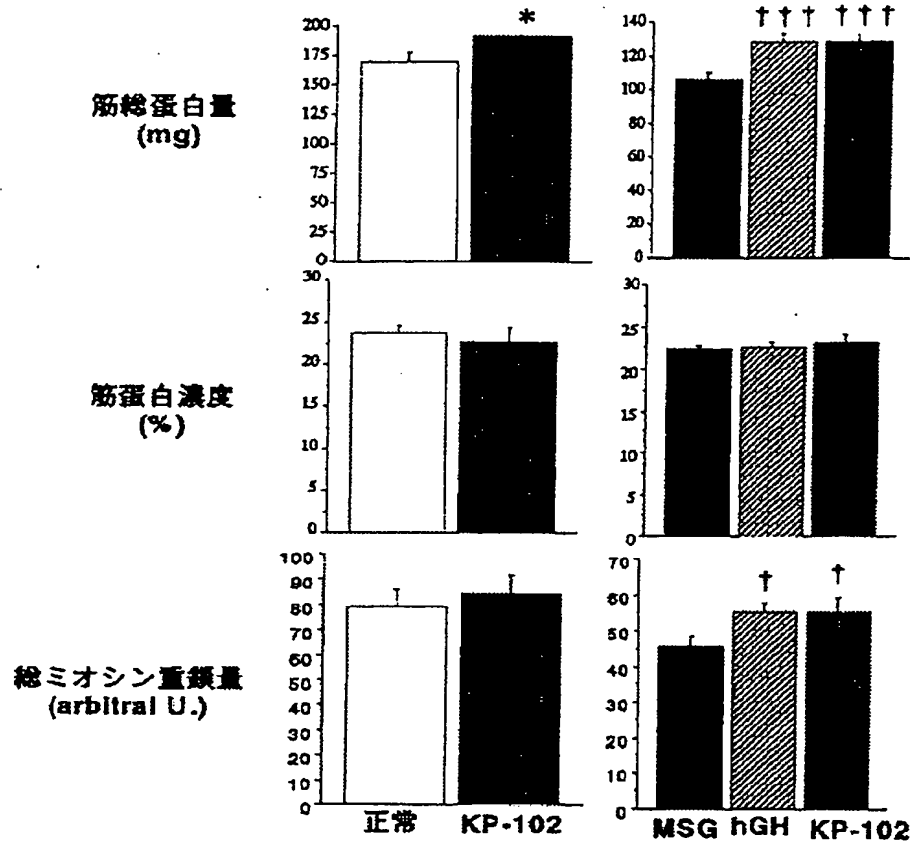
【図 3】

【図 3】MSG群の下肢骨格筋重量に対するrhGHおよびKP-102投与の効果を表す図



【図 4】

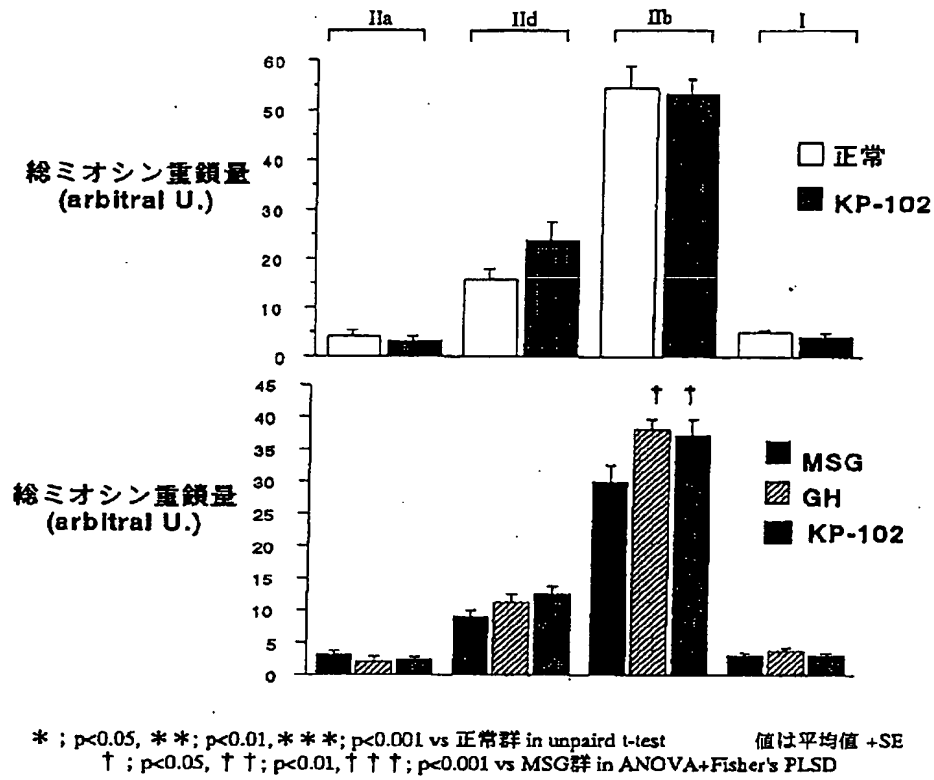
【図 4】 筋総蛋白含量、筋蛋白濃度、および総ミオシン重鎖量



* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$ vs 正常群 in unpaired t-test 値は平均値 + SE
 † ; $p < 0.05$, †† ; $p < 0.01$, ††† ; $p < 0.001$ vs MSG群 in ANOVA+Fisher's PLSD

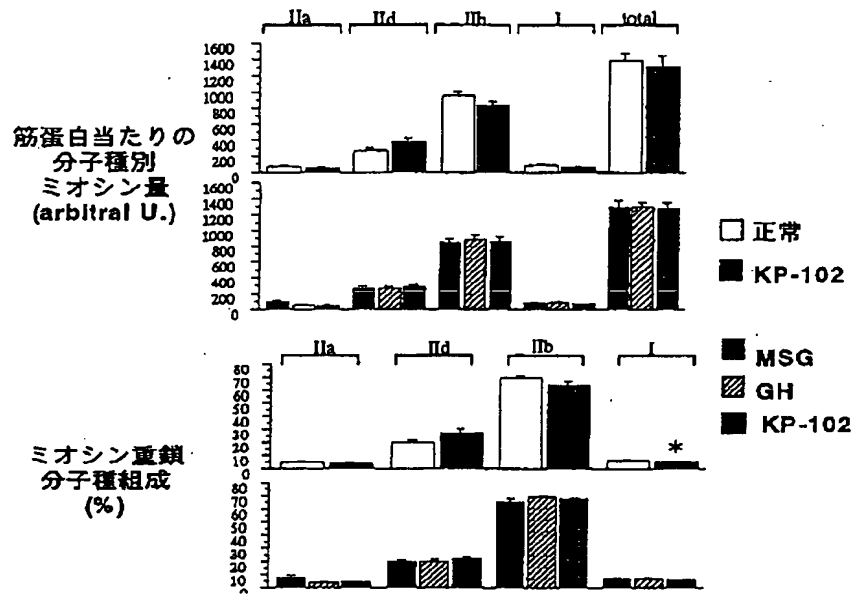
【図5】

【図5】ミオシン重鎖分子種ごとの蛋白量を表す図



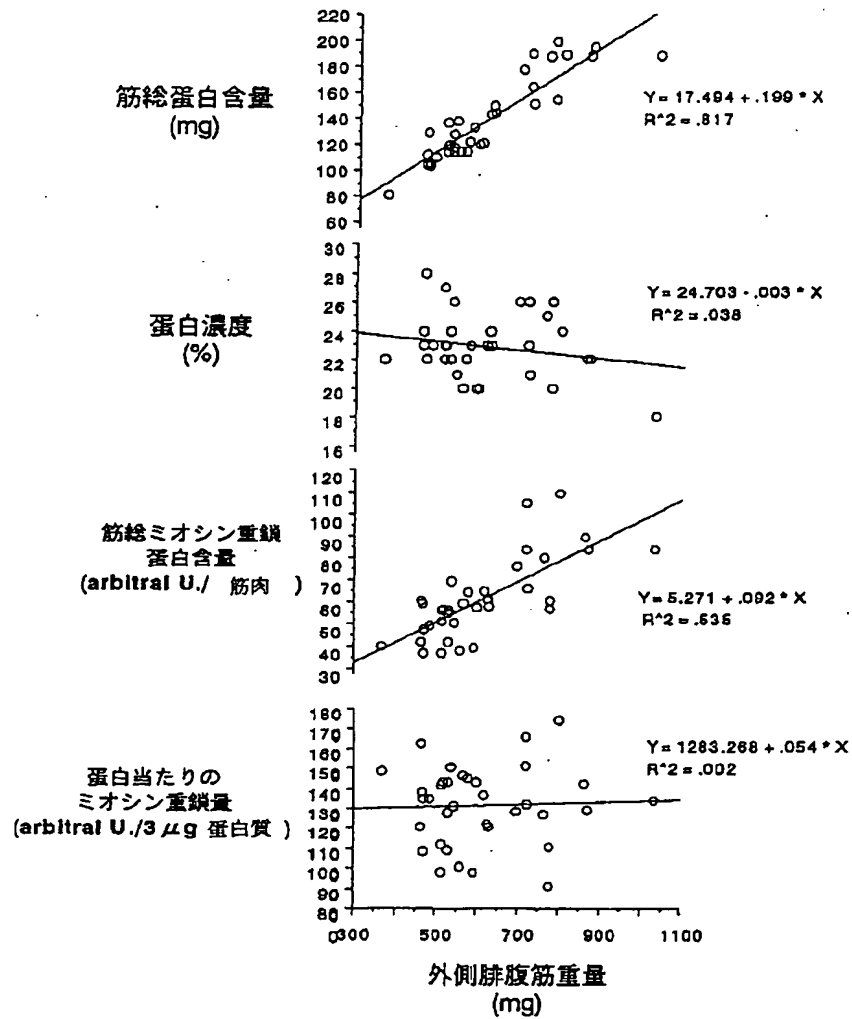
【図6】

【図6】筋蛋白当たりのミオシン量およびミオシン重鎖分子種組成を表す図



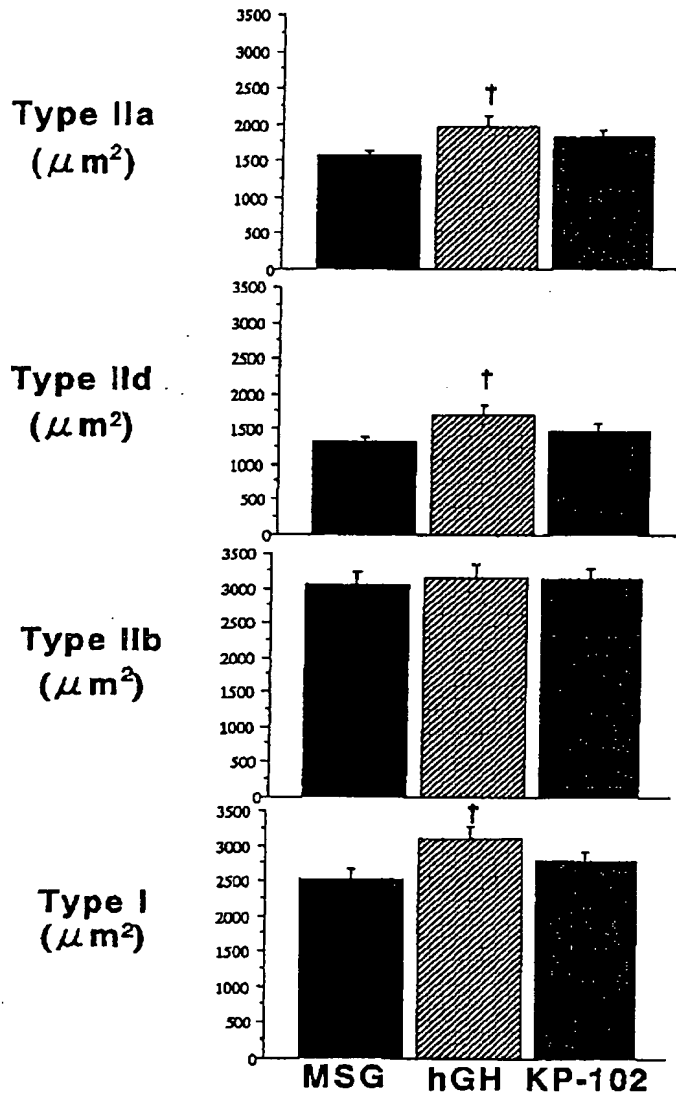
【図 7】

【図 7】筋重量と相関分析を表す図



【図8】

【図8】筋繊維横断面積を表す図

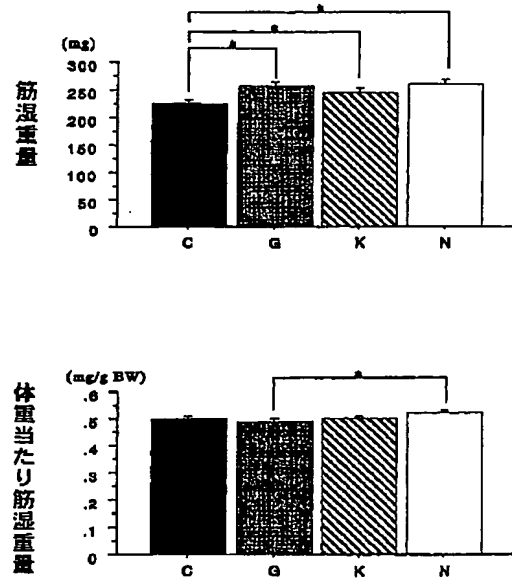


値は平均値 ± SE

† ; p<0.05, ††; p<0.01, †††; p<0.001 vs MSG群 in ANOVA+Fisher's PLSD

【図10】

【図10】長指伸筋湿重



値は平均値 ± SE *; p<0.05

C: 換肢豚—生食群 G: 換肢豚—rhGH K: 換肢豚—KP-102 群
N: 正常—生食群

フロントページの続き

(72)発明者 土井 直巳

京都府京都市山科区四宮南河原町14 科研
製薬株式会社総合研究所内Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA09 BA16
BA23 CA59 DB22 NA14 ZA942
ZC032

BEST AVAILABLE COPY